

日 本 国 特 許 庁 02.12.2004
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 1 月 1 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 8 0 9 8 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 8 0 9 8 7.]

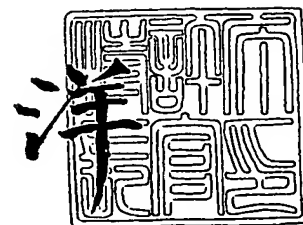
出 願 人 株式会社カネカ
Applicant(s):



2 0 0 5 年 1 月 1 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 B030435
【提出日】 平成15年11月11日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 9/02
C12P 7/02

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工
業所内
【氏名】 川野 茂

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工
業所内
【氏名】 八十原 良彦

【特許出願人】
【識別番号】 000000941
【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社
【代表者】 武田 正利

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 005027
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

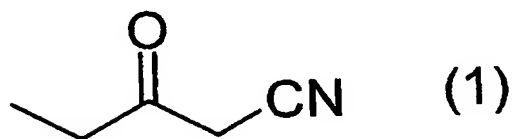
【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

以下の (1) 及び (2) の理化学的性質を有するアセトアセチル CoA 還元酵素:

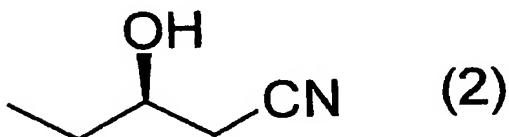
(1) 作用: NADPH もしくは NADH を補酵素として、下記式 (1):

【化 1】



で表される 3-ケトペンタンニトリルに作用して、下記式 (2):

【化 2】



で表される光学純度 99% e. e. 以上の (R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する、

(2) 分子量: ゲル濾過分析において約 85500、SDS ポリアクリルアミド電気泳動分析において約 26000。

【請求項 2】

更に、以下の (3) から (5) の理化学的性質を有する請求項 1 記載のアセトアセチル CoA 還元酵素:

(3) 至適温度: 27~33℃、

(1) 至適 pH: 5.5~6.5、

(2) 阻害剤: p-クロロメルクリ安息香酸、硫酸銅、硝酸銀、塩化水銀で阻害される。

【請求項 3】

下記 (a) 又は (b) のいずれかに記載のポリペプチドであるアセトアセチル CoA 還元酵素:

(a) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、1 または複数のアミノ酸が付加、欠失または置換したアミノ酸配列からなり、3-ケトペンタンニトリルに作用して、光学純度 99% e. e. 以上の (R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有するポリペプチド。

【請求項 4】

アクロモバクター (*Achromobacter*) 属に属する微生物由来である請求項 1~3 のいずれか 1 項に記載のアセトアセチル CoA 還元酵素。

【請求項 5】

アクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス (*Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*) に属する微生物由来である請求項 1~3 のいずれか 1 項に記載のアセトアセチル CoA 還元酵素。

【請求項 6】

アクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス (*Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*) IF015125 株由来である請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のアセトアセチル CoA 還元酵素。

【請求項 7】

請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のアセトアセチル CoA 還元酵素をコードする DNA。

【請求項 8】

配列表の配列番号 2 で示される塩基配列からなる DNA。

【請求項 9】

請求項 7 または 8 に記載の DNA を含有する組換えベクター。

【請求項 10】

図 2 において pNTAX で示される請求項 9 記載の組換えベクター。

【請求項 11】

グルコース脱水素酵素をコードする DNA を更に含有する請求項 10 記載の組換えベクター。

【請求項 12】

前記グルコース脱水素酵素がバシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 由来のものである請求項 11 記載の組換えベクター。

【請求項 13】

請求項 9～12 のいずれか 1 項に記載の組換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

【請求項 14】

請求項 7 または 8 に記載の DNA を含有する第 1 の組換えベクター、及びグルコース脱水素酵素をコードする DNA を含有する第 2 の組換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

【請求項 15】

第 1 の組換えベクターが前記 pNTAX であり、前記グルコース脱水素酵素がバシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 由来のものである請求項 14 記載の形質転換体。

【請求項 16】

第 1 の組換えベクターが前記 pNTAX であり、第 2 の組換えベクターが図 2 において pSTVG で示される組換えベクターである請求項 14 記載の形質転換体。

【請求項 17】

宿主細胞が大腸菌である請求項 13～16 のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

【請求項 18】

E. coli HB101 (pNTAX) (FERM P-19565) である請求項 17 に記載の形質転換体。

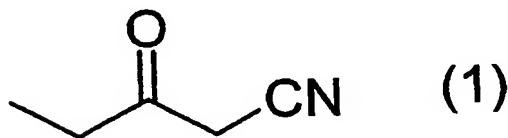
【請求項 19】

E. coli HB101 (pNTAX, pSTVG) (FERM P-19567) である請求項 17 に記載の形質転換体。

【請求項 20】

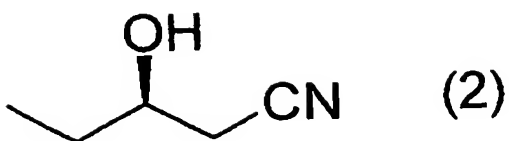
下記式 (1) :

【化 3】



で表される 3-ケトペンタンニトリルに、アセトアセチル CoA 還元酵素を作用させることを特徴とする、下記式 (2)

【化4】



で表される (R) - 3 - ヒドロキシペンタンニトリルの製造方法。

【請求項 21】

生成する (R) - 3 - ヒドロキシペンタンニトリルの光学純度が 95% e. e. 以上である請求項 20 に記載の製造方法。

【請求項 22】

下記式 (3) :

【化5】



(式中、R は置換されていても良く、分岐していても良い低級アルキル基を示す) で表されるアセト酢酸エステルに、アセトアセチル CoA 還元酵素を作用させることを特徴とする、下記式 (4)

【化6】

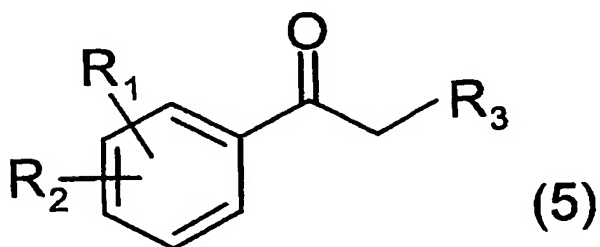


(式中、R は前記と同じ) で表される (R) - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルの製造方法。

【請求項 23】

下記式 (5) :

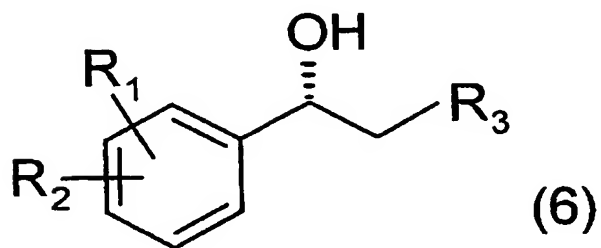
【化7】



(式中、R₁、R₂ は水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基、またはニトロ基を示し、それぞれ同一でも異なってもよい。また R₃ は水素原子、ハロゲン原子、水酸基、又は

置換されていてもよいアルキル基を示す) で表される 1-フェニルエタノン誘導体に、アセトアセチル CoA 還元酵素を作用させることを特徴とする、下記式 (6)

【化 8】

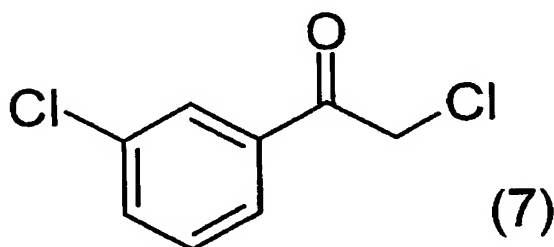


(式中、R1、R2、R3は前記と同じ) で表される光学活性 1-フェニルエタノール誘導体の製造方法。

【請求項 24】

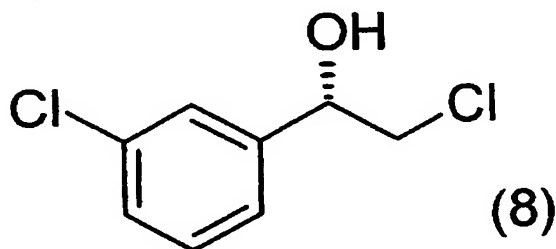
下記式 (7) :

【化 9】



で表される 2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノンに、アセトアセチル CoA 還元酵素を作用、下記式 (8)

【化 10】



で表される (R)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールを製造する、請求項 23 記載の製造方法。

【請求項 25】

Achromobacter、Acinetobacter、Ralstonia、Alcaligenes、Azospirillum、Azotobacter、Bacillus、Chromatium、Ectothiorhodospira、Lupinus、Methylobacterium、Methylobacterium、Paracoccus、Rhizobium、Rhodococcus、Synechococcus、Syntrophomonas、Thiocapsa、又は Zoogloea に属する微生物由来のアセトアセチル CoA 還元酵素を用いる請求項 20 から 24 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 26】

請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のアセトアセチル CoA 還元酵素を用いる請求項 20～24 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 27】

アセトアセチル CoA 還元酵素として、請求項 13～19 のいずれか 1 項に記載の形質転換体の培養物を用いる請求項 20～24 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 28】

アセトアセチル CoA 還元酵素として下記 (a)～(c) のいずれかに記載のポリペプチドを用いる請求項 20～24 のいずれか 1 項に記載の製造方法：

(a) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸が付加、欠失または置換したアミノ酸配列からなり、3-ケトペンタンニトリルを不斉還元し、光学純度 95% e. e. 以上の (R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有するポリペプチド、

(c) 配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列と相補する塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA がコードするポリペプチドであって、3-ケトペンタンニトリルを不斉還元し光学純度 95% e. e. 以上の (R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有するポリペプチド。

【請求項 29】

アセトアセチル CoA 還元酵素がラルストニア (*Ralstonia*) 属に属する微生物由来である、請求項 28 に記載の製造方法。

【請求項 30】

アセトアセチル CoA 還元酵素がラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) に属する微生物由来である請求項 28 に記載の製造方法。

【請求項 31】

請求項 28～30 のいずれか 1 項に記載のアセトアセチル CoA 還元酵素に加え、更にグルコース脱水素酵素を発現させた形質転換体を用いる、請求項 20～25 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 32】

配列表の配列番号 4 で示される塩基配列からなる DNA を含有し、図 3 において pNTRE として示される組換えベクター。

【請求項 33】

組換え大腸菌 *E. coli* HB101 (pNTRE)。

【請求項 34】

組換え大腸菌 *E. coli* HB101 (pNTRE, pSTVG)。

【請求項 35】

アセトアセチル CoA 還元酵素として、請求項 33 または 34 に記載の形質転換体の培養物を使用することを特徴とする、請求項 20～24 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】新規アセトアセチルCoA還元酵素および光学活性アルコールの製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、有用な新規アセトアセチルCoA還元酵素に関する。また、本発明は、当該酵素又は既知のアセトアセチルCoA還元酵素を用いた光学活性アルコール類、とりわけ(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル、光学活性3-ヒドロキシブタン酸エステル或いは光学活性1-フェニルエタノール誘導体の製造方法に関する。(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル、光学活性3-ヒドロキシブタン酸エステル及び光学活性1-フェニルエタノール誘導体等の光学活性アルコールは、各種医薬品・農薬などの合成原料或いは中間体として有用な化合物である。

【背景技術】

【0002】

光学活性3-ヒドロキシペンタンニトリル、特に(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルは、種々の医薬品や農薬などの製造原料や合成中間体として非常に有用である。そのため、高光学純度の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを高収率かつ工業的に実施可能な製造方法の開発が強く求められてきた。

【0003】

従来、(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの製造方法としては、ラセミ体3-アセトキシペンタンニトリルをシュードモナス・セパシア・リパーゼ(Pseudomonas cepacia lipase)を用いて不斉加水分解して、(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルと(S)-3-アセトキシペンタンニトリルに光学分割する方法が知られている(非特許文献1を参照)。この方法の場合、光学純度90%e.e.の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルが得られるが、酵素の使用量は基質の2分の1重量と多く、かつ収率も29%と低く、経済的な製造方法とはいえない。

【0004】

更に、上記非特許文献1には、前記の不斉加水分解反応において、チオクラウンエーテル(1, 4, 8, 11-テトラチアシクロテトラデカン)を添加することにより、光学純度99%e.e.以上の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルが収率49%で得られると記載されている。しかしながら、反応に必要なチオクラウンエーテルの量は基質の10分の1重量と非常に多いため、コスト面及び安全面から工業的な実施には適していない。また、この非特許文献1の技術では、反応生成物である(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルと(S)-3-アセトキシペンタンニトリルの分離をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて行っているが、この分離法も繁雑であって実用的ではなく、工業的に採用するには有利な方法ではない。

【0005】

上記のような状況下、本発明者らは3-ケトペンタンニトリルを酵素で不斉還元して光学活性3-ヒドロキシペンタンニトリルを製造する方法を発明し、先に出願した(特許文献1)。この方法では、非常に簡便な方法で高光学純度(94.8%e.e.)の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを得ることができるが、更に高い光学純度の目的物を得るためには、改良の余地が残されていた。

【0006】

また、光学活性3-ヒドロキシブタン酸エステル、特に(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステルも、種々の医薬品や農薬などの製造原料や合成中間体として非常に有用である。

【0007】

(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステルの製造方法の一つに、アセト酢酸エステルを生体触媒で不斉還元して製造する方法がある。例えば、パン酵母を用いた方法(非特許文献2を参照)、ゲオトリカム・キャンディダム(*Geotrichum candidum*)やアスペルギル

ス・ニガー (*Aspergillus niger*) などの微生物を用いた方法 (非特許文献 3 を参照)、ゲオトリカム・キャンディダム (*Geotrichum candidum*) 由来のグリセロールデヒドロゲナーゼを用いた方法 (非特許文献 4 を参照) などが知られている。しかしながら、これらの方法はいずれも、その基質仕込み濃度及び基質から生成物への転換率が実用上十分ではなく、より効率の良い合成法が待ち望まれていた。

【0008】

また、光学活性 1-フェニルエタノール誘導体も、種々の医薬品や農薬などの製造原料や合成中間体として非常に有用である。

【0009】

光学活性 1-フェニルエタノール誘導体を酵素的不斉還元によって製造する方法としては、2-ハロー-1- (置換フェニル) エタノンに、アシビヤ (*Ashbya*) 属やオガタエア (*Ogataea*) 属などに属する微生物またはその処理物を作用させ、光学活性 2-ハロー-1- (置換フェニル) エタノールを得る方法 (特許文献 2、特許文献 3、特許文献 4 を参照) が開示されている。また、コリネバクテリウム・スピーシーズ (*Corynebacterium* sp.) ST-10 由来のフェニルアセトアルデヒド還元酵素の遺伝子を導入した組換え大腸菌を用いる同様の方法 (非特許文献 5 を参照) が開示されている。しかしながら、これらの方法はいずれも、その基質の仕込み濃度及び基質から生成物への転換率が低く、より効率の良い製造方法が望まれていた。

【0010】

一方、NADH もしくは NADPH を補酵素としてアセトアセチル CoA を還元する酵素 (アセトアセチル CoA 還元酵素) は、種々の微生物から単離され、その性質が報告されているが (例えば、非特許文献 6、7 など)、この酵素を 3-ケトペンタンニトリル、アセト酢酸エステルあるいは 1-フェニルエタノン誘導体にアセトアセチル CoA 還元酵素を作用させ、対応する光学活性アルコールを製造することは報告されていない。

【特許文献 1】 WO 03/031636

【特許文献 2】 WO 92/01804

【特許文献 3】 特開平 11-215995

【特許文献 4】 WO 03/00911

【非特許文献 1】 Journal of Organic Chemistry, 62, 9165 (1997) 2)

【非特許文献 2】 Enzyme and Microbial Technology, 31, 656 (2002)

【非特許文献 3】 Journal of the Chemical Society, Chemical Communication, 7, 461 (1984)

【非特許文献 4】 Tetrahedron Lett., 29, 2453 (1988)

【非特許文献 5】 Eur. J. Biochem., 269, 2394 (2002)

【非特許文献 6】 FEMS Microbiol. Lett., 52, 259-264 (1988)

【非特許文献 7】 J. Microbiol. Biotechnol., 6, 425-431 (1996)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の目的は、光学活性アルコール、とりわけ (R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの製造に極めて有用な新規アセトアセチル CoA 還元酵素を提供することである。更に、本発明の目的は、光学活性アルコール、とりわけ (R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル、(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステル及び光学活性 1-フェニルエタノン誘導体の効率的な製造方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは鋭意検討の結果、意外にもアセトアセチルCoA還元酵素が3-ケトペンタニトリル、アセト酢酸エステルあるいは1-フェニルエタノン誘導体を不斉還元し、(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル、(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステル、光学活性1-フェニルエタノール誘導体を生成しうることを見出した。

【0013】

また、3-ケトペンタンニトリルを不斉還元し、光学純度99% e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有する今までに報告例のない新規アセトアセチルCoA還元酵素を見出し、単離することに成功した。更に、該酵素をコードするDNAを単離し、組換えベクター並びに該酵素を大量発現する形質転換体を創製することにも成功し、本発明を完成するに至った。

【0014】

すなわち本発明は、NADPHもしくはNADHを補酵素として、3-ケトペンタンニトリルに作用して光学純度99% e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する新規アセトアセチルCoA還元酵素に関する。また、本アセトアセチルCoA還元酵素をコードするDNA、及び該DNAを含有する組換えベクター、及び、上記アセトアセチルCoA還元酵素を高生産する形質転換体に関する。

【0015】

また、本発明は、該形質転換体を用いた、光学純度99% e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの実用的な製造方法に関する。

【0016】

また、本発明は、アセトアセチルCoA還元酵素を用いた、(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル、(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステル、光学活性1-フェニルエタノール誘導体といった有用な各種光学活性アルコールの実用的な製造方法に関する。

【発明の効果】

【0017】

本発明によれば、高光学純度の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル、(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステル、光学活性1-フェニルエタノール誘導体といった有用な光学活性アルコールを簡便な方法で製造することができる。とりわけ、(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルに関しては、95% e. e. 以上、本発明の新規アセトアセチルCoA還元酵素を用いれば99% e. e. 以上の、従来にない極めて高い光学純度の製品を得ることが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下、詳細に本発明を説明する。

本発明におけるアセトアセチルCoA還元酵素とは、アセトアセチルCoAを還元する能力(アセトアセチルCoA還元活性)を有するすべての酵素を包含する。アセトアセチルCoA還元活性は、例えば、以下の方法により測定できる。

【0019】

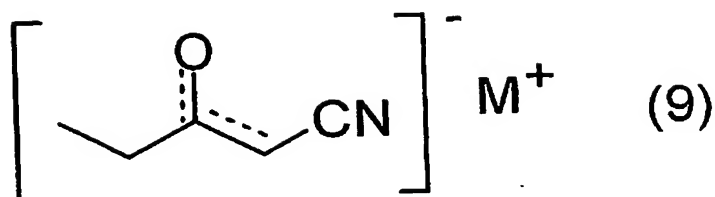
100mMリン酸緩衝液(pH6.5)に、アセトアセチルCoA 0.25mM、NADPHもしくはNADH 0.25mM、及び酵素を含む反応液を、30℃で反応させ、NADPHもしくはNADHの消費に伴う波長340nmの吸光度の減少により測定できる。

【0020】

また、本発明で使用する3-ケトペンタンニトリルは、例えば、WO94/21617に記載の方法で合成可能である。また、3-ケトペンタンニトリルとして、WO03/031636に記載の方法で得られる下記式(9)：

【0021】

【化 1 1】



【0022】

(式中、Mはアルカリ金属を示す) で表される 3-ケトペンタンニトリルアルカリ金属塩、例えば 3-ケトペンタンニトリルナトリウム塩なども使用し得る。

【0023】

まず、本発明の一つである新規アセトアセチル CoA 還元酵素について詳述する。

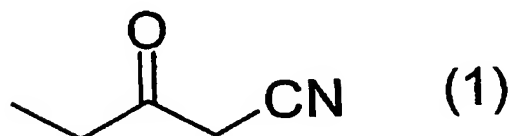
【0024】

本発明のアセトアセチル CoA 還元酵素としては、以下の (1) 及び (2) の理化学的性質を有するアセトアセチル CoA 還元酵素が挙げられる。

(1) 作用: NADPH もしくは NADH を補酵素として、下記式 (1) :

【0025】

【化 1 2】

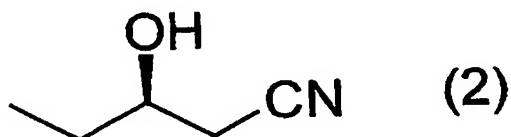


【0026】

で表される 3-ケトペンタンニトリルに作用して、下記式 (2) :

【0027】

【化 1 3】



【0028】

で表される光学純度 99% e. e. 以上の (R) - 3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する、

(2) 分子量: ゲル濾過分析において約 85500、SDS ポリアクリルアミド電気泳動分析において約 26000。

【0029】

また、本発明のアセトアセチル CoA 還元酵素としては、例えば、配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列からなるポリペプチド、または、配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列において、1 または複数のアミノ酸が付加、欠失または置換したアミノ酸配列からなり、3-ケトペンタンニトリルに作用して、光学純度 99% e. e. 以上の (R) -

3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有するポリペプチドを挙げることができる。

【0030】

配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が付加、欠失または置換したアミノ酸配列からなるポリペプチドは、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc., 1989年)等に記載の公知の方法に準じて調製することが可能であり、3-ケトペンタンニトリルに作用して、光学純度99% e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有する限り、本発明のアセトアセチルCoA還元酵素に包含される。また、アミノ酸の変異は自然界において生じることもあり、人工的にアミノ酸を変異したポリペプチドのみならず、自然界においてアミノ酸が変異したポリペプチドについても、3-ケトペンタンニトリルに作用して、光学純度99% e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有する限り、本発明のアセトアセチルCoA還元酵素に包含される。

【0031】

ここで、「3-ケトペンタンニトリルに作用して、光学純度99% e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性」は、例えば、以下ような反応ならびに測定条件によって確認することができる。

【0032】

あらかじめ3-ケトペンタンニトリル5mg、NADPH50mg及び1Mリン酸緩衝液(pH6.5)50 μ lを入れた試験管に、酵素溶液(或いは無細胞抽出液)450 μ lを加えて、30℃で1晩振とうする。反応液を酢酸エチル1mlで抽出し、生成した3-ヒドロキシペンタンニトリルの光学純度をキャピラリーガスクロマトグラフィーにより測定する。

[キャピラリーガスクロマトグラフィー分析条件]

カラム: Chiradex G-TA (20m \times 0.25mm) (ASTEC社製)、検出: FID

カラム温度: 120℃

注入温度: 200℃

検出温度: 200℃

キャリアーガス: ヘリウム (100kPa)

スプリット比: 100/1

溶出時間: (R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル 4.37分、(S)-3-ヒドロキシペンタンニトリル 5.17分。

【0033】

本発明のアセトアセチルCoA還元酵素は、3-ケトペンタンニトリルを(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルに変換する能力を有する微生物、動物または植物から見いだすことができる。本発明のアセトアセチルCoA還元酵素の探索方法としては、例えば、WO03/031636に記載の方法などが挙げられる。

【0034】

例えば、酵母からは以下のように探索すればよい。グルコース40g、酵母エキス3g、リン酸水素二アンモニウム6.5g、リン酸二水素カリウム1g、硫酸マグネシウム7水和物0.8g、硫酸亜鉛7水和物60mg、硫酸鉄7水和物90mg、硫酸銅5水和物5mg、硫酸マンガン4水和物10mg、塩化ナトリウム100mg(いずれも1L当たり)の組成からなる液体培地(pH7)5mlを試験管に入れて殺菌後、無菌的に酵母を接種し、30℃で2~3日間振とう培養する。その後、菌体を遠心分離により集め、グルコース2~10%を含んだリン酸緩衝液1~5mlに懸濁し、あらかじめ3-ケトペンタンニトリルを2.5~25mg入れた試験管に加えて、2~3日間30℃で振とうする。この反応の際、酵母を破碎してから実施しても良い。また、NAD⁺及び/またはNADP⁺と、グルコース脱水素酵素及びグルコース、もしくはギ酸脱水素酵素及びギ酸、を添加してもよい。変換反応ののち適当な有機溶媒で抽出を行ない、生成する3-ヒドロキシ

ペンタンニトリルをキャピラリーガスクロマトグラフィーなどで分析すればよい。

【0035】

本発明のアセトアセチルC o A還元酵素の由来としては、例えば、アクロモバクター (*Achromobacter*) 属細菌を挙げることができ、好ましくはアクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス (*Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*)、より好ましくはアクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス (*Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*) IF015125株である。

【0036】

以下に、3-ケトペンタンニトリルを不斉還元して(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する能力を有する微生物から、本発明の酵素を取得する方法を記載するが、本発明はこれに限定されない。

【0037】

微生物を適切な培地で培養し、培養液から菌体を遠心分離した後、菌体を適当な緩衝液中に懸濁する。該菌体をグラスビーズ等の物理的手法、酵素などの生化学的手法などを用いて破碎または溶解し、更に遠心分離などにより該溶液中の固形物を除去することにより、本発明の酵素を含む溶液を得ることができる。あるいは、培養液から菌体を分離することなく、直接上記と同様の方法で酵素溶液を得ることもできる。

【0038】

また、当業者が通常用いる酵素の精製手法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、透析、クロマトグラフィーを単独でまたは組み合わせて実施しても良い。クロマトグラフィーとしては、例えば、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等が挙げられる。これにより、不要なタンパク質を含まない、より純度の高い酵素溶液を得ることができる。

【0039】

本発明のアセトアセチルC o A還元酵素をコードするDNAは、上述のアセトアセチルC o A還元酵素をコードするDNAであればいずれも含まれる。例えば、配列表の配列番号2で示される塩基配列からなるDNAを挙げることができる。

【0040】

以下に、本発明の酵素をコードするDNAを取得する方法の例を記載するが、本発明はこれに限定されない。

【0041】

まず、精製した酵素を適当なエンドペプチダーゼにより消化し、逆相HPLCにより切断された断片を精製後、プロテインシーケンサーにより部分アミノ酸配列の一部を決定する。そして、得られた部分アミノ酸配列をもとにして、PCR (Polymerase Chain Reaction) プライマーを合成する。次に、該DNAの起源となる微生物より、通常のDNA単離法、例えばHereford法 (Cell, 18, 1261 (1979)) により、該微生物の染色体DNAを調製する。この染色体DNAを鋳型として、先述のPCRプライマーを用いてPCRを行い、該ポリペプチドをコードするDNAの一部を増幅(コア配列)し、塩基配列決定を行う。塩基配列決定はジデオキシ・チェイン・ターミネーション法等により決定し得る。例えば、ABI 373A DNA Sequencer (Applied Biosystems社製) 等を用いて行われ得る。

【0042】

次に、コア配列の周辺領域の塩基配列を明らかにするために、該微生物の染色体DNAを、コア配列中にその認識配列が存在しない制限酵素により消化し、生成したDNA断片をT4リガーゼにより自己環化させることにより逆PCR (Inverse PCR) (Nucleic Acids Res. 16, 8186 (1988)) 用の鋳型DNAを調製する。次に、コア配列をもとに、コア配列の外側に向かうDNA合成の開始点となるプライマーを合成し、逆PCRによりコア配列の周辺領域を増幅する。こうして得られたDNAの塩基配列を明らかにすることにより、目的アセトアセチルC o A還元酵素の全コード領域のDNA配列を明らかにし得る。

【0043】

本発明のアセトアセチルC o A還元酵素をコードするDNAを宿主微生物内に導入し、それをその導入された宿主微生物内で発現させるために用いられるベクターとしては、適切な宿主微生物内で該ポリペプチド遺伝子を発現できるものであればいずれもが用いられ得る。このようなベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクターなどが挙げられる。また、他の宿主株との間での遺伝子交換が可能なシャトルベクターも使用され得る。このようなベクターは、作動可能に連結されたプロモーター（lacUV5プロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、lppプロモーター、tufBプロモーター、recAプロモーター、pLプロモーター等の制御因子を含み、本発明のDNAと作動可能に連結された発現単位を含む発現ベクターとして好適に用いられ得る。例えば、pUCNT (WO94/03613) 等が好適に用いられ得る。

【0044】

本明細書で用いる用語「制御因子」は、機能的プロモーター及び、任意の関連する転写要素（例えばエンハンサー、CCAATボックス、TATAボックス、SPI部位など）を有する塩基配列をいう。

【0045】

本明細書で用いる用語「作動可能に連結」は、遺伝子が発現するように、DNAが、その発現を調節するプロモーター、エンハンサー等の種々の調節エレメントとが宿主細胞中で作動し得る状態で連結されることをいう。制御因子のタイプ及び種類が、宿主に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

【0046】

本発明のDNAを有するベクターを導入する宿主細胞としては、細菌、酵母、糸状菌、植物細胞、動物細胞などが挙げられ、導入の容易さや発現効率の観点からは細菌が好ましく、大腸菌が特に好ましい。本発明のDNAは、定法により宿主細胞に導入し得る。宿主細胞として大腸菌を用いた場合、例えば塩化カルシウム法により本発明のDNAを導入することができる。

【0047】

本発明のアセトアセチルC o A還元酵素もしくは該還元酵素の生産能を有する組換え体を用いて、3-ケトペンタンニトリルを不斉還元し、光学純度99% e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを合成する場合、補酵素としてNADPHまたはNADHが必要となる。反応系にNADPHまたはNADHを必要な量だけ添加しても実施しうるが、酸化された該補酵素(NADP⁺またはNAD⁺)を還元型(NADPHまたはNADH)に変換する能力（以後補酵素再生能力と呼ぶ）を有する酵素をその基質と共に、つまり補酵素再生系を本発明の酵素と組み合わせて反応を行うことにより、高価な補酵素の使用量を大幅に削減することができる。

【0048】

補酵素再生能力を有する酵素としては、ヒドロゲナーゼ、ギ酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素及びグルコース脱水素酵素等を用いることができる。好適には、グルコース脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素が用いられ、特にグルコース脱水素酵素が好ましい。このような反応は、補酵素再生系を不斉還元反応系内に添加することによっても行われ得るが、本発明の酵素をコードするDNA及びグルコース脱水素酵素をコードするDNAの両者により形質転換された形質転換体を触媒とした場合は、補酵素再生能を有する酵素を別に調製し反応系内に添加しなくても、効率的に反応を行うことができる。このような形質転換体は、本発明のアセトアセチルC o A還元酵素をコードするDNA及びグルコース脱水素酵素をコードするDNAを、同一のベクターに組み込み、これを宿主細胞に導入することにより得られる他、これら2種類のDNAを不和合性グループの異なる2種のベクターにそれぞれ組み込み、それらを同一の宿主細胞に導入することによっても得られ得る。

【0049】

次に、3-ケトペンタンニトリルをアセトアセチルC o A還元酵素で不斉還元して、（

R) -3-ヒドロキシペンタンニトリルを製造する方法について詳述する。

【0050】

本方法に用いるアセトアセチルC o A還元酵素は、その起源を問わず使用することができる。微生物由来のものだけでなく、動物または植物由来のものでも良い。

【0051】

例えば、アシネトバクター・エスピー (Acinetobacter sp.) RA3849由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (J. Bacteriol., 177, 4501-4507 (1995))、ラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha) 由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (FEMS Microbiol. Lett., 52, 259-264 (1988))、アルカリゲネス・ラタス (Alcaligenes latus) 由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (J. Microbiol. Biotechnol., 6, 425-431 (1996))、アゾスピリラム・ブラシレンス (Azospirillum brasilense) 由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (J. Gen. Microbiol., 136, 1191-1196 (1990)、Mol. Gen. Genet., 231, 375-384 (1992))、アゾトバクター・バイジェリンキー (Azotobacter beijerinckii) 由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (Biochem. J., 134, 225-238 (1973))、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) 由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (Can. J. Microbiol., 41(Suppl. 1), 77-79 (1995))、クロマチウム・ビノーサム (Chromatium vinosum) D株由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (Eur. J. Biochem., 209, 135-150 (1992))、エクトチオロドスピラ・シャボシュニコビー (Ectothiorhodospira shaposhnikovii) 由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 292-300 (1993))、ルピナス・ルテウス (Lupinus luteus) 由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (Plant Soil, 56, 379-390 (1980))、メチロバクテリウム・エクストークエンス (Methylobacterium extorquens) 由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (FEMS Microbiol. Lett., 156, 275-279 (1997))、メチロバクテリウム・ロデシアナム (Methylobacterium rhodesianum) MB126由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (Arch. Microbiol., 161, 277-280 (1994))、パラコッカス・デニトリフィカンス (Paracoccus denitrificans) 由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (FEMS Microbiol. Rev., 103, 257-264 (1992)、FEMS Microbiol. Lett., 133, 85-90 (1995))、リゾビウム・ルピニ (Rhizobium lupini) 由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (Fiziol. Rast. (Moscow), 27, 544-550 (1980))、リゾビウム・メリロティ (Rhizobium meliloti) 41由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (Microbiology, 141, 2553-2559 (1995))、ロドコッカス・ルーバー (Rhodococcus ruber) NCIMB40126由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (FEMS Microbiol. Rev., 103, 93-101 (1992))、シネココッカス・エスピー (Synechococcus sp.) 由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (特開平08-187085)、シントロフォモナス・ウォルフエイ・サブスピーシーズ・ウォルフエイ (Syntrophomonas wolfei subsp. wolfei) 由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (Arch. Microbiol., 159, 16-20 (1993))、チオカプサ・フェニギー (Thiocapsa pfennigii) 由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 292-300 (1993))、ズーグロエア・ラミゲラ (Zoogloea ramigera) I-16-M由来のアセトアセチルC o A還元酵素 (Arch. Microbiol., 114, 211-217 (1977)、J. Biol. Chem. 262, 97-102 (1987)) など、既知のアセトアセチルC o A還元酵素などが挙げられる。

【0052】

また、先に詳述した本発明の新規アセトアセチルC o A還元酵素であってもよく、例えば、配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。

【0053】

更に、本方法に用いるアセトアセチルC o A還元酵素として、以下の(a)から(c)のいずれかのポリペプチドを挙げることができる。

(a) 配列表の配列番号3に示したアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b) 配列表の配列番号3に示したアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が付加、

欠失または置換したアミノ酸配列からなり、3-ケトペンタンニトリルに作用して、光

学純度 95% e. e. 以上の (R) - 3 - ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有するポリペプチド、

(c) 配列表の配列番号 4 に示した塩基配列と相補する塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件でハイブリダイズする DNA がコードするポリペプチドであり、かつ、3 - ケトペンタンニトリルに作用して、光学純度 95% e. e. 以上の (R) - 3 - ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有するポリペプチド。

【0054】

本ポリペプチドの由来としては、ラルストニア (*Ralstonia*) 属に属する微生物が好ましく、特に好ましくはラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) である。

【0055】

配列表の配列番号 4 に示した塩基配列と相補する塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件でハイブリダイズする DNA とは、配列表の配列番号 4 に示した全塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する DNA をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、あるいはサザン・ハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA を意味する。具体的には、コロニーあるいはブランク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0M の NaCl はブランク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、0.1~2 倍濃度の SSC 溶液 (1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、150 mM 塩化ナトリウム、15 mM クエン酸ナトリウムよりなる) を用い、65℃ の条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA をあげることができる。

【0056】

ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A laboratory manual, second edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 年) 等に記載されている方法に準じて行なうことができる。ハイブリダイズ可能な DNA として具体的には、配列表の配列番号 4 に示した塩基配列と、配列同一性が 60% 以上、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、更に好ましくは 95% 以上の DNA を挙げることができ、コードされるポリペプチドが、3 - ケトペンタンニトリルを不斉還元し、光学純度 95% e. e. 以上の (R) - 3 - ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有する限り、本発明に使用することができる。

【0057】

ここで、「配列の同一性 (%)」とは、対比される 2 つの DNA を最適に整列させ、核酸塩基 (例えば、A、T、C、G、U、または I) が両方の配列で一致した位置の数を比較塩基総数で除し、そして、この結果に 100 を乗じた数値で表される。

【0058】

上記のアセトアセチル CoA 還元酵素を 3 - ケトペンタンニトリルに作用させることにより、光学純度 95% e. e. 以上の (R) - 3 - ヒドロキシペンタンニトリルを得ることができる。特に、前述した新規アセトアセチル CoA 還元酵素を用いた場合には、光学純度 99% e. e. 以上の極めて光学純度の高い (R) - 3 - ヒドロキシペンタンニトリルを得ることができる。

【0059】

なお、上記のアセトアセチル CoA 還元酵素のアミノ酸配列もしくは該酵素をコードする DNA の塩基配列が既に明らかな場合は、先に詳述した本発明の新規アセトアセチル CoA 還元酵素の場合と同様に操作することで、該酵素を大量発現する形質転換体を調製し、この形質転換体を用いて還元反応を行ってもよい。

【0060】

アセトアセチル CoA 還元酵素を発現させた形質転換体を用いて、3 - ケトペンタンニトリルを還元して (R) - 3 - ヒドロキシペンタンニトリルを製造する場合、以下のように実施され得る。但し、以下の方法に限定されるわけではない。

【0061】

まず最初に、適当な溶媒中に基質 3 - ケトペンタンニトリルもしくは 3 - ケトペンタン

ニトリルアルカリ金属塩、例えば 3-ケトペンタンニトリルのナトリウム塩を加え、 NADP^+ 等の補酵素、及び該形質転換体の培養物を添加し、 pH 調整下、攪拌して反応させる。この反応は $5\sim 80^\circ\text{C}$ 、好ましくは $10\sim 60^\circ\text{C}$ 、より好ましくは $20\sim 40^\circ\text{C}$ の温度で行われ、反応中、反応液の pH は $3\sim 10$ 、好ましくは $4\sim 9$ 、より好ましくは $5\sim 8$ に維持する。反応はバッチ式あるいは連続方式で行われ得る。

【0062】

バッチ方式の場合は、反応基質は $0.01\sim 70\%$ (w/v)、好ましくは $0.1\sim 50\%$ 、より好ましくは $0.5\sim 30\%$ の仕込み濃度で添加されうる。反応の途中で基質である 3-ケトペンタンニトリルを添加する場合は、3-ケトペンタンニトリルをそのまま添加しても良いし、また 3-ケトペンタンニトリルアルカリ金属塩、例えば 3-ケトペンタンニトリルのナトリウム塩など、を添加しても良い。

【0063】

ここで形質転換体の培養は、培養液、菌体は言うまでもなく、凍結乾燥菌体、アセトン乾燥菌体、あるいはそれらの磨砕物、粗酵素液、精製酵素であってもよく、更に公知の手段で固定化された固定化酵素若しくは固定化菌体であってもよい。

【0064】

また、本反応を行う際、形質転換体としてアセトアセチル CoA 還元酵素とグルコース脱水素酵素の両者を生産するものを用いる場合、反応系に更にグルコースを添加することによって、補酵素の使用量を大幅に減らすことが可能となる。

【0065】

反応液からの (R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの採取方法は特に限定されないが、反応液から直接、あるいは菌体等を分離後、酢酸エチル、トルエン、 α -ブチルメチルエーテル、ヘキサン、塩化メチレン等の溶剤で抽出し、脱水後、蒸留あるいはシリカゲルカラムクロマトグラフィー等により精製すれば、高純度の (R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルが容易に得られる。

【0066】

また、下記一般式 (3)

【0067】

【化 14】



【0068】

(式中、R は置換されていても良く、分岐していても良い低級アルキル基を示す) で示されるアセト酢酸エステルに、アセトアセチル CoA 還元酵素を作用させることにより、下記一般式 (4)

【0069】

【化 15】



【0070】

(式中、Rは置換されていても良く、分岐していても良い低級アルキル基を示す)で示される(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステルを効率的に製造することができる。Rは分岐していても良い炭素鎖1~5のアルキル基が好ましく、より好ましくはメチル基、エチル基である。

【0071】

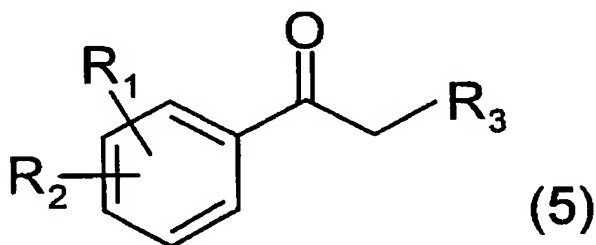
本反応に用いるアセトアセチルCoA還元酵素は、アセト酢酸エステルを(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステルへ還元するものであれば、その起源を問わず使用することができ、本発明の新規アセトアセチルCoA還元酵素や前記の既知のアセトセチルCoA還元酵素を好適に用いることができる。また、これら酵素を大量発現させた形質転換体を先に述べた方法と同様に育種し、これを用いることもできる。本反応は、先に述べた3-ケトペンタンニトリルの還元反応と同様に実施すればよい。

【0072】

また、下記式(5)：

【0073】

【化16】

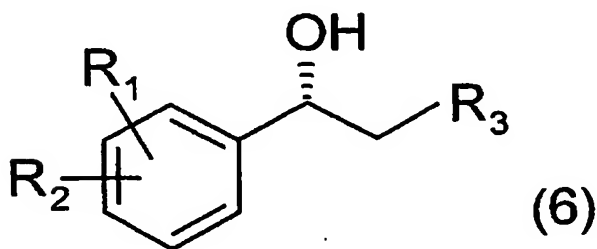


【0074】

(式中、R₁、R₂は水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基、またはニトロ基を示し、それぞれ同一でも異なってもよい。またR₃は水素原子、ハロゲン原子、水酸基、又は置換されていてもよいアルキル基を示す)で表される1-フェニルエタノン誘導体に、アセトアセチルCoA還元酵素を作用させることにより、下記式(6)

【0075】

【化17】

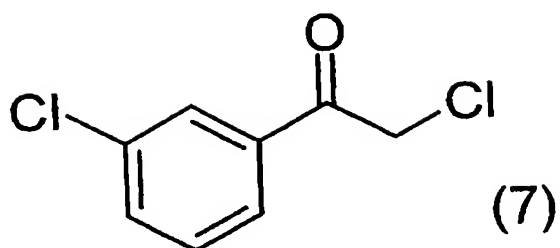


【0076】

(式中、R₁、R₂、R₃は前記と同じ)で表される光学活性1-フェニルエタノール誘導体を効率的に製造することができる。特に下記式(7)：

【0077】

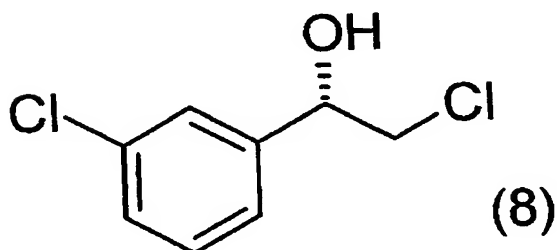
【化18】



【0078】
 で表される 2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノンに、アセトアセチルCoA還元酵素を作用させることにより、下記式(8)

【0079】

【化19】



【0080】
 で表される (R)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールを効率的に製造することができる。

【0081】

本反応に用いるアセトアセチルCoA還元酵素は、1-フェニルエタノン誘導体を1-フェニルエタノール誘導体へ還元する活性、特に2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノンを(R)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールへ還元する活性を有するものであれば、その起源を問わず使用することができる。本発明の新規アセトアセチルCoA還元酵素や前記の既知のアセトセチルCoA還元酵素を好適に用いることができる。また、これら酵素を大量発現させた形質転換体を先に述べた方法と同様に育種し、これを用いることもできる。本反応は、先に述べた3-ケトペンタンニトリルの還元反応と同様に実施すればよい。

【実施例】

【0082】

以下、実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。なお、以下の記載において、「%」は特に断らない限り「重量%」を意味する。

【0083】

(実施例1) アクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス IF015125株からの新規アセトアセチルCoA還元酵素の精製

以後、3-ケトペンタンニトリルから3-ヒドロキシペンタンニトリルへの還元活性は、以下のように測定した。3-ケトペンタンニトリル5mg及びNADPH30mgを入れた試験管に、1Mリン酸緩衝液(pH6.5)0.05ml及びポリペプチド(酵素)溶液0.45mlを加えて、30℃で1時間振とうした。これに酢酸エチル1mlを加えて十分に攪拌後、遠心分離する。有機層を下記キャピラリーガスクロマトグラフィー条件

で分析を行い、生成した3-ヒドロキシペンタンニトリル量を求めた。この条件において、1分間に $1\mu\text{mol}$ の3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成させる還元活性を1 unitと定義した。また、3-ヒドロキシペンタンニトリルの光学純度についても、下記キャピラリーガスクロマトグラフィー条件で分析して求めた。

【0084】

[キャピラリーガスクロマトグラフィー分析条件]

カラム: Chiradex G-TA (20m×0.25mm) (ASTEC社製)、検出: FID

カラム温度: 120℃

注入温度: 200℃

検出温度: 200℃

キャリアーガス: ヘリウム (100kPa)

スプリット比: 100/1

溶出時間: (R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル 4.37分、(S)-3-ヒドロキシペンタンニトリル 5.17分。

【0085】

肉エキス10g、ペプトン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム3g (いずれも1L当たり)の組成からなる液体培地 (pH7) 100mlを坂口フラスコに分注し、120℃で20分間蒸気殺菌を行った。この液体培地を10本用意し、これにアクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス (*Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*) IF015125株を無菌的に一白金耳接種して、30℃で40時間振とう培養した。得られた培養液500mlについて、遠心分離により菌体を集め、10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) 200mlで洗浄し、湿菌体を1mMとなるようにβ-メルカプトエタノールを添加した10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) 30mlに懸濁した。そして、菌体を超音波破碎機 (プランソン社製) で破碎し、遠心分離にて菌体残渣を除き、無細胞抽出液25mlを取得した。これを1mMのβ-メルカプトエタノールを含む20mMリン酸緩衝液 (pH7.0) であらかじめ平衡化したTOYOPEARL DEAE-650M (東ソー社製) カラム (10ml) に供し、酵素を吸着させた後、塩化ナトリウム濃度 (0mMから500mMまで) を段階的に上げて溶出を行い、3-ケトペンタンニトリルの還元活性を有する画分を取得した。活性画分を集め、1mMのβ-メルカプトエタノールを含む20mMリン酸緩衝液 (pH7.0) であらかじめ平衡化したHiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) カラムに供した。活性画分について、更に1mMのβ-メルカプトエタノールを含む20mMリン酸緩衝液 (pH7.0) であらかじめ平衡化した2'5' ADP Sepharose 4B (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) カラム (18ml) に供し、酵素を吸着させた後、塩化ナトリウム濃度 (0mMから1.0Mまで) のリニアグラジエントにより活性画分を溶出させた。以上の精製操作により、電気泳動的にはほぼ単一の精製ポリペプチド標品を得た。SDS電気泳動におけるバンドの分子量は約26000であった。本精製酵素を、NADPH存在下で3-ケトペンタンニトリルに作用させると、光学純度99.2% e. e. の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルが生成した。以後、本アセトアセチルCoA還元酵素をRAXと呼ぶこととした。

【0086】

(実施例2) 酵素の性質の測定

得られたRAXの酵素化学的性質について調べた。

【0087】

(1) 作用

NADPHを補酵素として、3-ケトペンタンニトリルに作用して、光学純度99.2% e. e. の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルへ還元した。NADPHのかわりにNADHを補酵素として、実施例1に記載の方法で3-ケトペンタンニトリル還元活性を測定したところ、NADPHを補酵素とした場合の約15%の活性を示した。

【0088】

更に、アセトアセチルCoA及び4-クロロアセト酢酸エチルに対する還元活性を調べた。100mMリン酸緩衝液(pH6.5)に、アセトアセチルCoA 0.25mMもしくは4-クロロアセト酢酸エチル10mM、NADPH 0.25mM及び酵素を含む反応液を30℃で反応させ、NADPHの消費に伴う波長340nmの吸光度の減少を測定することにより、それぞれの基質に対する還元活性を求めた。この反応条件において、1分間に1 μ molのNADPHをNADP⁺に酸化する酵素活性を1 unitと定義した。その結果、アセトアセチルCoA、4-クロロアセト酢酸エチルの両化合物に対して還元活性を有しており、実施例1に記載の方法で求めた3-ケトペンタンニトリルに対する還元活性のそれぞれ約7.6倍、約3.2倍の値を示した。

【0089】

(2) 作用至適温度

RAXの作用至適温度を調べるため、10～50℃における4-クロロアセト酢酸エチル還元活性を測定した。活性測定は、100mMリン酸緩衝液(pH6.5)に基質4-クロロアセト酢酸エチル10mM、補酵素NADPH 0.25mM及び酵素を添加し、10～50℃で3分間反応させ、波長340nmの吸光度の減少を測定することにより行った。その結果、至適温度は27～33℃であった。

【0090】

(3) 作用至適pH

RAXの作用至適pHを調べるため、pH4～9における4-クロロアセト酢酸エチル還元活性を測定した。酵素活性は、緩衝液に基質4-クロロアセト酢酸エチル10mM、補酵素NADPH 0.25mM及び酵素を添加し、30℃で3分間反応させ、波長340nmの吸光度の減少を測定することにより行った。緩衝液として100mMリン酸緩衝液、100mM酢酸緩衝液もしくは100mMトリス塩酸緩衝液を用いて、pH4～9の範囲で活性を測定した。その結果、至適pHは5.5～6.5であった。

【0091】

(4) 阻害剤

4-クロロアセト酢酸エチルに対する還元活性を、各種化合物及び金属塩を添加した条件で測定した。活性測定は、100mMリン酸緩衝液(pH6.5)に基質4-クロロアセト酢酸エチル10mM、補酵素NADPH 0.25mM、酵素及び阻害剤を添加し、30℃で3分間反応させ、波長340nmの吸光度の減少を測定することにより行った。阻害剤を添加しない時の活性を100%とし、阻害剤添加時の活性を相対活性で表1にまとめた。

【0092】

【表1】

阻害剤	濃度 (mM)	相対活性
なし	-	100
ヨード酢酸	1.0	98
N-エチルマレイミド	1.0	103
p-クロロメルクリ安息香酸	1.0	0
フッ化フェニルメチルスルホニル	1.0	108
EDTA	1.0	83
MgSO ₄	1.0	100
MnCl ₂	1.0	97
ZnSO ₄	1.0	81
CoCl ₂	1.0	108
CuSO ₄	1.0	0
AgNO ₃	0.1	0
HgCl ₂	0.01	0

【0093】

その結果、酵素活性は p-クロロメルクリ安息香酸、硫酸銅、硝酸銀、塩化水銀により阻害された。

【0094】

(5) 分子量

溶離液として 150 mM の塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用い、Superdex 200 HR 10/30 (ファルマシアバイオテック社性) による精製酵素のゲル濾過クロマトグラフィー分析を行なった結果、標準タンパク質との相対保持時間から算出した本酵素の分子量は約 85500 であった。

【0095】

(実施例 3) RAX 遺伝子のクローニング

実施例 1 で得られた精製酵素を 8 M 尿素存在下で変性させた後、アクロモバクター由来のリシルエンドペプチダーゼ (和光純薬工業社製) で消化し、得られたペプチド断片のアミノ酸配列をエドマン法により決定した。

【0096】

上記アミノ酸配列から予想される DNA 配列を考慮し、プライマー 1 (5' -CARG GNTAYACNTTYTAYG-3' : 配列番号 5) 及びプライマー 2 (5' -GCD ATYTCYTCNGGNGTYCC-3' : 配列番号 6) を合成した。プライマー 2 種 (プライマー 1 及びプライマー 2) 各 100 pmol、アクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス IFO15125 株の染色体 DNA 866 ng、dNTP 各 10 nmol、ExTaq (宝酒造社製) 2.5 U を含む ExTaq 用緩衝液 100 µl を調製し、熱変性 (96℃、1分)、アニーリング (50℃、1分)、伸長反応 (72℃、1分) を 30 サイクル行い、4℃まで冷却後、アガロースゲル電気泳動により増幅 DNA を確認した。

【0097】

本反応に用いたアクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス IFO15125 株の染色体 DNA の調製は、分子生物学実験プロトコル 1 (丸善) P. 36 に記載されている細菌ゲノム DNA の少量調製法により行なった。増幅 DNA を pT7Blue Vector (Novagen 社製) にサブクローニングし、その塩基配列を決定

した。その結果、増幅DNAはプライマー配列を含めて503塩基からなっていた。その配列は、図1に示したDNA配列において、二重下線を引いたDNA配列部分である。以後この配列を「コア配列」と記す。

【0098】

コア配列の5' - 側に近い部分の塩基配列を元に、その相補配列となるプライマー3 (5' - CGTCGGCGCTCATCTTGCGGAACAG-3' : 配列番号7) を作成し、更に3' - 側に近い部分の塩基配列を元に、プライマー4 (5' - AGGGCATCACGGTCAACACGGTGTC-3' : 配列番号8) を作製した。逆PCRの鋳型として、まずアクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス IF015125株の染色体DNAを制限酵素SphIにより消化し、消化物をT4 DNAリガーゼを用いて自己閉環した。この自己閉環物300ng、プライマー2種 (プライマー3及びプライマー4) 各50pmol、dNTP各10nmol、ExTaq (宝酒造社製) 2.5Uを含む ExTaq用緩衝液50μlを調製し、熱変性 (97℃、0.5分)、アニーリング (68℃、1分)、伸長反応 (72℃、5分) を30サイクル行い、4℃まで冷却後、アガロースゲル電気泳動により増幅DNAを確認した。

【0099】

増幅DNAをpT7Blue Vector (Novagen社製) にサブクローニングし、その塩基配列を決定した。この結果とコア配列の結果より、RAXをコードする遺伝子の全塩基配列を決定した。全塩基配列及び該遺伝子がコードする推定アミノ酸配列を図1にまとめた。図1中、一重下線は、精製RAXをリジルエンドペプチダーゼ消化して生じたペプチド断片において、エドマン法により決定できたアミノ酸配列を示す。

【0100】

(実施例4) RAX遺伝子を含む組換えベクターの作製)

大腸菌においてRAXを発現させるために、形質転換に用いる組換えベクターを作製した。まず、RAX遺伝子の開始コドン部分にNdeI部位を付加し、かつ終始コドンの直後に新たな終始コドンとEcoRI部位を付加した二本鎖DNAを以下の方法により取得した。

【0101】

実施例2で決定した塩基配列に基づき、RAX遺伝子の開始コドン部分にNdeI部位を付加したプライマー5 (5' - GTACATATGAGCGGAAACTGGCTTACG-3' : 配列番号9)、及びRAX遺伝子の終始コドンの直後に新たな終始コドンとEcoRI部位を付加し、更にNdeI部位を破壊するために一塩基置換したプライマー6 (5' - GTAGAAATTCTTATCAGCCCATGTGCAGGCCGCCG-3' : 配列番号10) を合成した。プライマー2種 (プライマー5及びプライマー6) 各100pmol、アクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス IF015125株の染色体DNA132ng、dNTP各20nmol、ExTaq (宝酒造社製) 2.5Uを含む ExTaq用緩衝液100μlを調製し、熱変性 (97℃、0.5分)、アニーリング (65℃、1分)、伸長反応 (72℃、1分) を30サイクル行い、4℃まで冷却後、アガロースゲル電気泳動により増幅DNAを確認した。この増幅断片をNdeI及びEcoRIで消化し、プラスミドpUCNT (WO94/03613) のlacプロモーターの下流のNdeI、EcoRI部位に挿入することにより、組換えベクターpNTAXを得た。pNTAXの作製法及び構造を図2に示す。

【0102】

(実施例5) RAX遺伝子及びグルコース脱水素酵素遺伝子の両者を同時に含む組換えベクターの作製

バシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) IAM1030株由来のグルコース脱水素酵素 (以後GDHと記す) の遺伝子の開始コドンから5塩基上流に大腸菌のShine-Dalgarno配列 (9ヌクレオチド) を、更にその直前にEcoRI切断点を、また、終始コドンの直後にSalI切断点を付加した二本鎖DNAを、以下の方法により取得した。

【0103】

GDH遺伝子の塩基配列情報を基に、GDHの構造遺伝子の開始コドンから5塩基上流に大腸菌のShine-Dalgarno配列(9ヌクレオチド)を、更にその直前にEcoRI切断点を付加したプライマー7(5'-GCCGAATTCTAAGGAGGTAAACAATGTATAAAGATTTAGAAGG-3':配列番号11)と、終始コドンの直後にSalI部位を付加したプライマー8(5'-GCGGTCGACTTATCCGCGTCCTGCTTGG-3':配列番号12)を常法に従って合成した。これら2つのプライマーを用いて、プラスミドpGDK1(Eur. J. Biochem., 186, 389 (1989))を鋳型としてPCRによる二本鎖DNAを合成した。得られたDNA断片をEcoRI及びSalIで消化し、実施例3において構築したpNTAXのEcoRI-SalI部位に挿入した組換えベクターpNTAXGを得た。pNTAXGの作製法及び構造を図2に示す。

【0104】

(実施例6) RAXを生産する組換え大腸菌の作製

実施例4で得た組換えベクターpNTAX及び実施例5で得た組換えベクターpNTAXGを用いて大腸菌HB101(宝酒造社製)を形質転換し、各々から組換え大腸菌HB101(pNTAX)及びHB101(pNTAXG)を得た。大腸菌HB101(pNTAX)は受託番号FERM P-19565として、平成15年10月23日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

【0105】

また、実施例5で作成した組換えプラスミドpNTAXGをEcoRI及びPstIで二重消化して得られるGDH遺伝子を含む約0.8kbのDNA断片を、プラスミドpSTV28(宝酒造社製)のEcoRI-PstI部位に挿入して、組換えベクターpSTVGを構築した。pSTVGの作製法及び構造を図2に示す。このpSTVGで、予め塩化カルシウム法でコンピテント化しておいた大腸菌HB101(pNTAX)を形質転換し、大腸菌HB101(pNTAX, pSTVG)を得た。こうして得られた形質転換体である大腸菌HB101(pNTAX, pSTVG)は、受託番号FERM P-19567として、平成15年10月23日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

【0106】

(実施例7) 組換え大腸菌におけるRAX及びGDHの発現

バクト・トリプトン1.6%(w/v)、バクト・イーストエキス1.0%(w/v)、NaCl0.5%(w/v)の組成からなる2×YT培地(pH7)50mlを500ml容坂口フラスコに分注し、120℃で20分間蒸気殺菌を行った。実施例5で得た組換え大腸菌HB101(pNTAX)、HB101(pNTAXG)、HB101(pNTAX, pSTVG)、及びベクタープラスミドのみの形質転換体である大腸菌HB101(pUCNT)のそれぞれを同培地に植菌後、37℃で18時間振とう培養した。但し、HB101(pNTAX)、HB101(pNTAXG)、HB101(pUCNT)の培養時には120μg/mlとなるようにアンピシリンを加え、またHB101(pNTAX, pSTVG)の培養時にはそれぞれ120μg/ml、50μg/mlとなるようにアンピシリン、クロラムフェニコールを加えた。集菌後、10mMリン酸緩衝液(pH7)に懸濁し、超音波破碎を行なうことにより無細胞抽出液を得た。各組換え大腸菌の無細胞抽出液について、3-ケトペンタンニトリル還元活性及びGDH活性を測定した。GDH活性の測定は、1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に、基質グルコース0.1M、補酵素NADP⁺2mM及び酵素を添加し、25℃で波長340nmの吸光度の増加を測定することにより行った。この反応条件において、1分間に1μmolのNADP⁺をNADPHに還元する酵素活性を1 unitと定義した。結果を表2に示す。

【0107】

【表2】

菌株名	3-ケトペンタンニトリル 還元比活性 (units/mg)	GDH比活性 (units/mg)
HB101 (pUCNT)	<0.1	<0.01
HB101 (pNTAX)	9.3	<0.01
HB101 (pNTAXG)	4.3	195
HB101 (pNTAX, pSTVG)	7.0	10

【0108】

大腸菌HB101 (pNTAX) では、ベクタープラスミドのみの形質転換体である大腸菌HB101 (pUCNT) と比較して明らかな3-ケトペンタンニトリル還元活性の増加がみられた。また、大腸菌HB101 (pNTAXG) 及び大腸菌HB101 (pNTAX, pSTVG) では、ベクタープラスミドのみの形質転換体である大腸菌HB101 (pUCNT) と比較して明らかな3-ケトペンタンニトリル還元活性及びGDH活性の増加がみられた。

【0109】

(実施例8) 組換え大腸菌HB101 (pNTAX) を用いた3-ケトペンタンニトリルからの(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの合成

組換え大腸菌HB101 (pNTAX) を実施例7と同様に培養、菌体破碎を行い、無細胞抽出液を調製した。あらかじめ3-ケトペンタンニトリル5mg、NADPH50mg及び1Mリン酸緩衝液(pH6.5)50 μ lを入れた試験管に、先の無細胞抽出液450 μ lを加えて、30℃で一晩振とうした。酢酸エチル1mlで2回抽出を行い、生成物である3-ヒドロキシペンタンニトリルの生成量と光学純度を測定したところ、生成量3.7mg、光学純度(R)99.2%e.e.であった。

【0110】

(実施例9) 組換え大腸菌HB101 (pNTAXG) を用いた3-ケトペンタンニトリルからの(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの合成

組換え大腸菌HB101 (pNTAXG) を実施例7と同様に培養後、菌体破碎を行い、無細胞抽出液を調製した。無細胞抽出液450 μ lに1Mリン酸緩衝液(pH6.5)50 μ l、グルコース13.9mg、NADP+1mg、3-ケトペンタンニトリル5mgを添加し、30℃で一晩攪拌した。反応後、生成物である3-ヒドロキシペンタンニトリルの生成量と光学純度を測定したところ、生成量4.5mg、光学純度99.2%e.e.であった。

【0111】

(実施例10) 組換え大腸菌HB101 (pNTAX, pSTVG) を用いた3-ケトペンタンニトリルからの(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの合成

組換え大腸菌HB101 (pNTAX, pSTVG) を実施例7と同様に培養した。得られた培養液20mlにグルコース5.0g、NADP+3mg、3-ケトペンタンニトリルのナトリウム塩0.2gを添加し、5Nの水酸化ナトリウム水溶液を滴下することによりpH6.5に調整しながら、30℃で攪拌した。反応後1.5時間目、3時間目、4.8時間目、5.7時間目、7時間目に各0.2gの3-ケトペンタンニトリルのナトリウム塩をそれぞれ添加した。また反応9.4時間目に培養液4mlとNADP+3mgを加えた。反応後24時間目に生成物である3-ヒドロキシペンタンニトリルの生成量と光学純度を測定したところ、生成量1.1g、光学純度99.2%e.e.であった。

【0112】

(実施例11) 組換え大腸菌HB101 (pNTAX, pSTVG) を用いた3-ケトペンタンニトリルからの(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの合成

組換え大腸菌HB101 (pNTAX, pSTVG) を実施例7と同様に培養した。1 Lのセパラブルフラスコに、得られた培養液400 ml、グルコース36.3 g、NAD P⁺ 50 mg、3-ケトペンタンニトリルのナトリウム塩3.5 gを入れ、pHを6.5に調整後、30℃で攪拌した。3-ケトペンタンニトリル水溶液を別に調製し、この溶液をオン交換水37 mlに溶解した3-ケトペンタンニトリル水溶液を加えることにより反応液のpHを6.5に保った。3-ケトペンタンニトリル水溶液を全量添加した後は、30%水酸化ナトリウム水溶液を添加して反応液をpH6.5に保った。反応終了後、反応液を酢酸エチルで抽出し、水相を更に酢酸エチルで抽出した。有機相を合わせて、減圧下で溶媒を留去後、蒸留により精製を行った。そして、光学純度99.2% e. e. の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル13.5 gを取得した。

【0113】

(実施例12) ラルストニア・ユートロファ ATCC17699株由来アセトアセチルCoA還元酵素をコードする遺伝子を含む組換えベクターの作製

ラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) 由来のアセトアセチルCoA還元酵素(以後RREと記す)を大腸菌で発現させるために、形質転換に用いる組換えベクターを作製した。RRE遺伝子を取得するにあたり、J. Biol. Chem., 264, 15293 (1989)で報告されているRRE遺伝子の塩基配列情報を参考にした。まず、RRE遺伝子の開始コドン部分にNdeI部位を付加し、かつ終始コドンの直後に新たな終始コドンとEcoRI部位を付加した二本鎖DNAを以下の方法により取得した。

【0114】

RREの構造遺伝子の開始コドン部分にNdeI部位を付加したプライマー9 (5'-AAGGAGTGCATATGACTCAGCGCATTTGCGTATGTG-3' : 配列番号13)、及び終始コドンの直後に新たな終始コドンとEcoRI部位を付加し、更にNdeI部位を破壊するために一塩基置換したプライマー10 (5'-GTA GAATTCTTATCAGCCCATGTGCAGGCCGCCG-3' : 配列番号14)を合成した。プライマー2種(プライマー9及びプライマー10)各100 pmol、ラルストニア・ユートロファ ATCC17699株の染色体DNA132 ng、dNTP各20 nmol、ExTaq (宝酒造社製) 2.5 Uを含む ExTaq用緩衝液100 µlを調製し、熱変性(97℃、0.5分)、アニーリング(65℃、1分)、伸長反応(72℃、1分)を30サイクル行い、4℃まで冷却後、アガロースゲル電気泳動により増幅DNAを確認した。PCRに使用したラルストニア・ユートロファ ATCC17699株の染色体DNAは、実施例2で記載したアクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス IFO15125株の染色体DNAの調製と同様に行なった。

【0115】

上記増幅断片をNdeI及びEcoRIで消化し、プラスミドpUCNT (WO94/03613)のlacプロモーター下流のNdeI-EcoRI部位に挿入することにより、組換えベクターpNTREを得た。pNTREの作製法及び構造を図2に示す。

【0116】

(実施例13) RREを生産する組換え大腸菌の作製

実施例12で得た組換えベクターpNTREを用いて大腸菌HB101 (宝酒造社製)を形質転換し、組換え大腸菌HB101 (pNTRE)を得た。こうして得られた形質転換体である大腸菌HB101 (pNTRE)は、受託番号FERM P-19566として、平成15年10月23日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

【0117】

また、実施例6で得られた組換えベクターpSTVGで、予め塩化カルシウム法でコンピテント化しておいた大腸菌HB101 (pNTRE)を形質転換し、大腸菌HB101 (pNTRE, pSTVG)を得た。こうして得られた形質転換体である大腸菌HB101 (pNTRE, pSTVG)は、受託番号FERM P-19568として、平成15

年10月23日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

【0118】

(実施例14) 組換え大腸菌におけるRRE及びGDHの発現

実施例13で得た組換え大腸菌HB101 (pNTRE)、HB101 (pNTRE, pSTVG)、及びベクタープラスミドのみの形質転換体である大腸菌HB101 (pUCNT) を実施例7と同様に培養後、無細胞抽出液を調製した。各組換え大腸菌の無細胞抽出液について、3-ケトペンタンニトリル還元活性及びGDH活性を測定した。結果を表3に示す。

【0119】

【表3】

菌株名	3-ケトペンタンニトリル 還元比活性 (units/mg)	GDH比活性 (units/mg)
HB101 (pUCNT)	<0.1	<0.01
HB101 (pNTRE)	3.6	<0.01
HB101 (pNTRE, pSTVG)	2.9	19

【0120】

大腸菌HB101 (pNTRE) では、ベクタープラスミドのみの形質転換体である大腸菌HB101 (pUCNT) と比較して明らかな3-ケトペンタンニトリル還元活性の増加がみられた。また、大腸菌HB101 (pNTRE, pSTVG) では、ベクタープラスミドのみの形質転換体である大腸菌HB101 (pUCNT) と比較して明らかな3-ケトペンタンニトリル還元活性及びGDH活性の増加がみられた。

【0121】

(実施例15) 組換え大腸菌HB101 (pNTRE) を用いた3-ケトペンタンニトリルからの (R) -3-ヒドロキシペンタンニトリルの合成

組換え大腸菌HB101 (pNTRE) を実施例7と同様に培養、菌体破碎を行い、無細胞抽出液を調製した。あらかじめ3-ケトペンタンニトリル5.0mg、NADPH 50mg及び1Mリン酸緩衝液 (pH6.5) 50 μ lを入れた試験管に、先の無細胞抽出液450 μ lを加えて、30℃で一晩振とうした。酢酸エチル1mlで2回抽出を行い、生成物である3-ヒドロキシペンタンニトリルの生成量と光学純度を測定したところ、生成量2.5mg、光学純度 (R) 98.4% e. e. であった。

【0122】

(実施例16) 組換え大腸菌HB101 (pNTRE, pSTVG) を用いた3-ケトペンタンニトリルからの (R) -3-ヒドロキシペンタンニトリルの合成

組換え大腸菌HB101 (pNTRE, pSTVG) を実施例7と同様に培養し培養液を取得した。培養液20mlにグルコース5.0g、NADP⁺ 3mg、3-ケトペンタンニトリルのナトリウム塩0.2gを添加し、5Nの水酸化ナトリウム水溶液を滴下することによりpH6.5に調整しながら、30℃で攪拌した。反応後2時間目、3時間目、5時間目、7時間目、8時間目に各0.2gの3-ケトペンタンニトリルのナトリウム塩をそれぞれ添加した。また反応10時間目に培養液4mlとNADP⁺ 3mgを加えた。反応後24時間目に生成物である3-ヒドロキシペンタンニトリルの生成量と光学純度を測定したところ、生成量1.0g、光学純度98.3% e. e. であった。

【0123】

(実施例17) 組換え大腸菌HB101 (pNTAX, pSTVG) を用いたアセト酢酸メチルからの (R) -3-ヒドロキシブタン酸メチルの合成

組換え大腸菌HB101 (pNTAX, pSTVG) を実施例7と同様に培養した。得られた培養液20mlにグルコース5.0g、NADP⁺ 3mg、アセト酢酸メチル0.

4 gを添加し、5 Nの水酸化ナトリウム水溶液を滴下することによりpH 6.5に調整しながら、30℃で攪拌した。反応後1.5時間目、3時間目、4.5時間目、5.5時間目、7時間目に各0.4 gのアセト酢酸メチルをそれぞれ添加した。反応後24時間目に生成物である3-ヒドロキシブタン酸メチルの生成量をキャピラリーガスクロマトグラフィーで分析した。

【分析条件】

カラム: TC-WAX (15m×0.25mm) (GLサイエンス社製)、検出: FID
、カラム温度: 85℃、注入温度: 200℃、検出温度: 200℃、キャリアーガス: ヘリウム (70 kPa)、スプリット比: 100/1、溶出時間: アセト酢酸メチル 2.9分、3-ヒドロキシブタン酸メチル 3.8分。

【0124】

また、生成した3-ヒドロキシブタン酸メチルの光学純度は、ジニトロベンゾイル化後、HPLC分析することにより測定した。3-ヒドロキシブタン酸メチルのジニトロベンゾイル化は、反応液から3-ヒドロキシブタン酸メチルを酢酸エチルで抽出後、ピリジン及び3,5-ジニトロ塩化ベンゾイルを3-ヒドロキシブタン酸メチルの1.2当量添加後、室温で2時間攪拌することにより行なった。1規定塩酸で洗浄後、分取用薄層クロマトグラフィーにより精製取得し、これをエタノールに溶解後、下記HPLC条件で分析した。

【0125】

【分析条件】

カラム: Chiralpak AD-H (ダイセル化学社製)、検出波長: 230 nm、カラム温度: 20℃、溶出液: n-ヘキサン/エタノール=3/7、流速: 0.7 ml/min、溶出時間: S体 21.7分、R体 29.8分。

【0126】

その結果、3-ヒドロキシブタン酸メチルの生成量は1.9 g、光学純度97.2% e.e.であった。

【0127】

(実施例18) 組換え大腸菌HB101 (pNTRE, pSTVG) を用いたアセト酢酸メチルからの (R)-3-ヒドロキシブタン酸メチルの合成

組換え大腸菌HB101 (pNTAX, pSTVG) のかわりに組換え大腸菌HB101 (pNTRE, pSTVG) を用いた以外は、実施例17と同様に反応を行ない、反応後24時間目に生成した3-ヒドロキシブタン酸メチルの生成量と光学純度を測定した。その結果、3-ヒドロキシブタン酸メチルの生成量は1.9 g、光学純度98.3% e.e.であった。

【0128】

(実施例19) 組換え大腸菌HB101 (pNTAX, pSTVG) を用いた2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノンからの (R)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノールの合成

組換え大腸菌HB101 (pNTAX, pSTVG) を実施例7と同様に培養した。得られた培養液20 mlにグルコース5.0 g、NADP⁺ 3 mg、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノン0.4 gを添加し、5 Nの水酸化ナトリウム水溶液を滴下することによりpH 6.5に調整しながら、30℃で攪拌した。反応後2時間目、4時間目、6時間目、8時間目に各0.4 gの2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノンをそれぞれ添加した。反応後24時間目に生成物である2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノールの生成量及び光学純度を下記条件で分析して求めた。

【0129】

【分析条件】

カラム: Chiralpak OJ (ダイセル化学社製)、検出波長: 210 nm、カラム温度: 20℃、溶出液: n-ヘキサン/イソプロパノール=39/1、流速: 1.0 ml/min、溶出時間: 2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノン 25.3

分、(R)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノール 38.4分、(S)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノール 44.0分。

【0130】

その結果、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールの生成量は1.9g、光学純度99.0% e. e. であった。

【0131】

(実施例20) 組換え大腸菌HB101 (pNTRE, pSTVG) を用いた2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールからの(R)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールの合成

組換え大腸菌HB101 (pNTAX, pSTVG) のかわりに組換え大腸菌HB101 (pNTRE, pSTVG) を用いた以外は、実施例19と同様に反応を行ない、反応後24時間目に生成した2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールの生成量と光学純度を測定した。その結果、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールの生成量は1.9g、光学純度99.9% e. e. であった。

【図面の簡単な説明】

【0132】

【図1】 RAXをコードする遺伝子の塩基配列及びRAXの推定アミノ酸配列。

【図2】 組換えベクターpNTAX、pNTAXG、pSTVGの構築。

【図3】 組換えベクターpNTREの構築。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 鐘淵化学工業株式会社

<120> 新規アセトアセチルC o A還元酵素および光学活性アルコールの製造方法

<130> B030435

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 245

<212> PRT

<213> *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*

<400> .1

Met Ser Gly Lys Leu Ala Tyr Val Thr Gly Gly Met Gly Gly Ile Gly
 1 5 10 15

Thr Ser Ile Cys Gln Arg Leu Ala Lys Asp Gly Phe Arg Val Val Ala
 20 25 30

Gly Cys Gly Pro Ser Arg Asn Tyr Gln Gln Trp Leu Asp Glu Gln Ala
 35 40 45

Ala Gln Gly Tyr Thr Phe Tyr Ala Ser Val Gly Asn Val Ser Asp Trp
 50 55 60

Glu Ser Thr Val Glu Ala Phe Glu Arg Val Lys Arg Asp Met Gly Pro
 65 70 75 80

Val Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Gly Leu Phe
 85 90 95

Arg Lys Met Ser Ala Asp Asp Trp Arg Ala Val Ile Asp Thr Asn Leu
 100 105 110

Asn Ser Leu Phe Asn Val Thr Lys Gln Val Ile Asp Asp Met Val Glu
 115 120 125

Arg Gln Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ser Ser Val Asn Gly Gln Lys
 130 135 140

Gly Gln Phe Gly Gln Thr Asn Tyr Ser Thr Ala Lys Ala Gly Ile His
 145 150 155 160

Gly Phe Thr Met Ala Leu Ala Gln Glu Val Ala Ser Lys Gly Ile Thr
 165 170 175

Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Tyr Ile Gly Thr Asp Met Val Arg Ala
180 185 190

Ile Arg Pro Asp Val Leu Glu Lys Ile Val Ala Thr Ile Pro Val Arg
195 200 205

Arg Leu Gly Thr Pro Glu Glu Ile Ala Ser Ile Thr Ser Trp Leu Ala
210 215 220

Ser Asp Glu Ser Gly Phe Ser Thr Gly Ala Asp Phe Ser Leu Asn Gly
225 230 235 240

Gly Leu His Met Gly
245

<210> 2

<211> 738

<212> DNA

<213> Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(738)

<223>

<400> 2

atg agc gga aaa ctg gct tac gtt aca ggc ggg atg ggc ggt atc ggc 48
Met Ser Gly Lys Leu Ala Tyr Val Thr Gly Gly Met Gly Gly Ile Gly
1 5 10 15

acc tca att tgc cag cgc ctg gcc aaa gat ggc ttt cgc gtg gtg gca 96
Thr Ser Ile Cys Gln Arg Leu Ala Lys Asp Gly Phe Arg Val Val Ala
20 25 30

ggc tgc ggc ccc agc cgc aat tac cag caa tgg ctg gat gaa cag gcg 144
Gly Cys Gly Pro Ser Arg Asn Tyr Gln Gln Trp Leu Asp Glu Gln Ala
35 40 45

gcg cag ggc tat acg ttc tac gcg tca gtg ggc aac gtg tcc gat tgg 192
Ala Gln Gly Tyr Thr Phe Tyr Ala Ser Val Gly Asn Val Ser Asp Trp
50 55 60

gag tcc acg gta gaa gca ttc gag cgc gtc aag cgg gac atg ggc ccg 240
Glu Ser Thr Val Glu Ala Phe Glu Arg Val Lys Arg Asp Met Gly Pro
65 70 75 80

gtc gat gtg ctg gtc aac aac gcg ggc atc acc cgc gac ggc ctg ttc 288
Val Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Gly Leu Phe
85 90 95

cgc aag atg agc gcc gac gac tgg cgc gcg gtc atc gac acc aac ctg 336
 Arg Lys Met Ser Ala Asp Asp Trp Arg Ala Val Ile Asp Thr Asn Leu
 100 105 110

aac agc ctc ttc aac gtg acc aag cag gtg atc gac gac atg gtc gag 384
 Asn Ser Leu Phe Asn Val Thr Lys Gln Val Ile Asp Asp Met Val Glu
 115 120 125

cgc cag tgg ggc cgc atc gtc aac atc agc tcg gtg aac ggg cag aag 432
 Arg Gln Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ser Ser Val Asn Gly Gln Lys
 130 135 140

ggg cag ttc ggc cag acg aac tat tcc acg gcg aag gcg ggc atc cat 480
 Gly Gln Phe Gly Gln Thr Asn Tyr Ser Thr Ala Lys Ala Gly Ile His
 145 150 155 160

ggc ttc acc atg gcg ctg gcg cag gaa gtg gcc agc aag ggc atc acg 528
 Gly Phe Thr Met Ala Leu Ala Gln Glu Val Ala Ser Lys Gly Ile Thr
 165 170 175

gtc aac acg gtg tcg ccg ggc tac atc ggc acg gac atg gtt cgc gcc 576
 Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Tyr Ile Gly Thr Asp Met Val Arg Ala
 180 185 190

atc cgt ccg gac gtg ctg gaa aag atc gtc gcc acc att ccg gtg cgc 624
 Ile Arg Pro Asp Val Leu Glu Lys Ile Val Ala Thr Ile Pro Val Arg
 195 200 205

cgc ctg ggc acg ccg gag gaa atc gcg tcc atc acg tcg tgg ctg gcc 672
 Arg Leu Gly Thr Pro Glu Glu Ile Ala Ser Ile Thr Ser Trp Leu Ala
 210 215 220

tcg gat gag tct ggg ttt tcg acg ggc gcg gac ttc tcg ctc aac ggc 720
 Ser Asp Glu Ser Gly Phe Ser Thr Gly Ala Asp Phe Ser Leu Asn Gly
 225 230 235 240

ggc ctg cat atg ggc tga 738
 Gly Leu His Met Gly
 245

<210> 3
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Ralstonia eutropha

<400> 3
 Met Thr Gln Arg Ile Ala Tyr Val Thr Gly Gly Met Gly Gly Ile Gly
 1 5 10 15

Thr Ala Ile Cys Gln Arg Leu Ala Lys Asp Gly Phe Arg Val Val Ala
20 25 30

Gly Cys Gly Pro Asn Ser Pro Arg Arg Glu Lys Trp Leu Glu Gln Gln
35 40 45

Lys Ala Leu Gly Phe Asp Phe Ile Ala Ser Glu Gly Asn Val Ala Asp
50 55 60

Trp Asp Ser Thr Lys Thr Ala Phe Asp Lys Val Lys Ser Glu Val Gly
65 70 75 80

Glu Val Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Val Val
85 90 95

Phe Arg Lys Met Thr Arg Ala Asp Trp Asp Ala Val Ile Asp Thr Asn
100 105 110

Leu Thr Ser Leu Phe Asn Val Thr Lys Gln Val Ile Asp Gly Met Ala
115 120 125

Asp Arg Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ser Ser Val Asn Gly Gln
130 135 140

Lys Gly Gln Phe Gly Gln Thr Asn Tyr Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu
145 150 155 160

His Gly Phe Thr Met Ala Leu Ala Gln Glu Val Ala Thr Lys Gly Val
165 170 175

Thr Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Tyr Ile Ala Thr Asp Met Val Lys
180 185 190

Ala Ile Arg Gln Asp Val Leu Asp Lys Ile Val Ala Thr Ile Pro Val
195 200 205

Lys Arg Leu Gly Leu Pro Glu Glu Ile Ala Ser Ile Cys Ala Trp Leu
210 215 220

Ser Ser Glu Glu Ser Gly Phe Ser Thr Gly Ala Asp Phe Ser Leu Asn
225 230 235 240

Gly Gly Leu His Met Gly
245

<210> 4

<211> 741

<212> DNA

<213> *Ralstonia eutropha*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(741)

<223>

<400> 4

atg	act	cag	cgc	att	gcg	tat	gtg	acc	ggc	ggc	atg	ggt	ggt	atc	gga	48
Met	Thr	Gln	Arg	Ile	Ala	Tyr	Val	Thr	Gly	Gly	Met	Gly	Gly	Ile	Gly	
1				5					10					15		

acc	gcc	att	tgc	cag	cgg	ctg	gcc	aag	gat	ggc	ttt	cgt	gtg	gtg	gcc	96
Thr	Ala	Ile	Cys	Gln	Arg	Leu	Ala	Lys	Asp	Gly	Phe	Arg	Val	Val	Ala	
			20					25					30			

ggt	tgc	ggc	ccc	aac	tcg	ccg	cgc	cgc	gaa	aag	tgg	ctg	gag	cag	cag	144
Gly	Cys	Gly	Pro	Asn	Ser	Pro	Arg	Arg	Glu	Lys	Trp	Leu	Glu	Gln	Gln	
		35					40					45				

aag	gcc	ctg	ggc	ttc	gat	ttc	att	gcc	tcg	gaa	ggc	aat	gtg	gct	gac	192
Lys	Ala	Leu	Gly	Phe	Asp	Phe	Ile	Ala	Ser	Glu	Gly	Asn	Val	Ala	Asp	
		50				55					60					

tgg	gac	tcg	acc	aag	acc	gca	ttc	gac	aag	gtc	aag	tcc	gag	gtc	ggc	240
Trp	Asp	Ser	Thr	Lys	Thr	Ala	Phe	Asp	Lys	Val	Lys	Ser	Glu	Val	Gly	
65					70					75				80		

gag	gtt	gat	gtg	ctg	atc	aac	aac	gcc	ggt	atc	acc	cgc	gac	gtg	gtg	288
Glu	Val	Asp	Val	Leu	Ile	Asn	Asn	Ala	Gly	Ile	Thr	Arg	Asp	Val	Val	
				85					90					95		

ttc	cgc	aag	atg	acc	cgc	gcc	gac	tgg	gat	gcg	gtg	atc	gac	acc	aac	336
Phe	Arg	Lys	Met	Thr	Arg	Ala	Asp	Trp	Asp	Ala	Val	Ile	Asp	Thr	Asn	
			100					105					110			

ctg	acc	tcg	ctg	ttc	aac	gtc	acc	aag	cag	gtg	atc	gac	ggc	atg	gcc	384
Leu	Thr	Ser	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	Lys	Gln	Val	Ile	Asp	Gly	Met	Ala	
		115					120					125				

gac	cgt	ggc	tgg	ggc	cgc	atc	gtc	aac	atc	tcg	tcg	gtg	aac	ggg	cag	432
Asp	Arg	Gly	Trp	Gly	Arg	Ile	Val	Asn	Ile	Ser	Ser	Val	Asn	Gly	Gln	
	130					135					140					

aag	ggc	cag	ttc	ggc	cag	acc	aac	tac	tcc	acc	gcc	aag	gcc	ggc	ctg	480
Lys	Gly	Gln	Phe	Gly	Gln	Thr	Asn	Tyr	Ser	Thr	Ala	Lys	Ala	Gly	Leu	
145					150					155					160	

cat	ggc	ttc	acc	atg	gca	ctg	gcg	cag	gaa	gtg	gcg	acc	aag	ggc	gtg	528
His	Gly	Phe	Thr	Met	Ala	Leu	Ala	Gln	Glu	Val	Ala	Thr	Lys	Gly	Val	

165	170	175	
acc gtc aac acg gtc tct ccg ggc tat atc gcc acc gac atg gtc aag			576
Thr Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Tyr Ile Ala Thr Asp Met Val Lys			
180	185	190	
gcg atc cgc cag gac gtg ctc gac aag atc gtc gcg acg atc ccg gtc			624
Ala Ile Arg Gln Asp Val Leu Asp Lys Ile Val Ala Thr Ile Pro Val			
195	200	205	
aag cgc ctg ggc ctg ccg gaa gag atc gcc tcg atc tgc gcc tgg ttg			672
Lys Arg Leu Gly Leu Pro Glu Glu Ile Ala Ser Ile Cys Ala Trp Leu			
210	215	220	
tcg tcg gag gag tcc ggt ttc tcg acc ggc gcc gac ttc tcg ctc aac			720
Ser Ser Glu Glu Ser Gly Phe Ser Thr Gly Ala Asp Phe Ser Leu Asn			
225	230	235	240
ggc ggc ctg cat atg ggc tga			741
Gly Gly Leu His Met Gly			
245			

<210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> プライマー 1

<400> 5
 carggntaya cnttytayg 19

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> プライマー 2

<400> 6
 gc datytcyt cnggngtycc 20

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 3

<400> 7

cgtcggcgct catcttgagg aacag

25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 4

<400> 8

aggcatcac ggtcaacacg gtgtc

25

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 5

<400> 9

gtacatatga gcggaaaact ggcttacg

28

<210> 10

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 6

<400> 10

gtagaattct tatcagccca tgtgcaggcc gccg

34

<210> 11

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 7

<400> 11

gccgaattct aaggaggta acaatgtata aagatttaga agg

43

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 8

<400> 12

gcggtcgact tatccgcgctc ctgcttgg

28

<210> 13

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 9

<400> 13

aaggagtgcataatgactcag cgcattgcgt atgtg

35

<210> 14

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 10

<400> 14

gtagaattct tatcagccca tgtgcaggcc gccg

34

【書類名】 図面

【図 1】

1 TCAATCAACGAGGCGTCCGTGCGACACAGGAGGAAATCCAATGAGCGGAAACTGGCTTA 60
M S G K L A Y

61 CGTTACAGGCGGGATGGGCGGTATCGGCACCTCAATTTGCCAGCGCCTGGCCAAAGATGG 120
V T G G M G G I G T S I C Q R L A K D G

121 CTTTCGCGTGGTGGCAGGCTGCGGCCCCAGCCGCAATTACCAGCAATGGCTGGATGAACA 180
F R V V A G C G P S R N Y Q Q W L D E Q

181 GCGGGCGCAGGGCTATACGTTCTACGCGTCAGTGGGCAACGTGTCCGATTGGGAGTCCAC 240
A A Q G Y T F Y A S V G N V S D W E S T

241 GGTAGAAGCATTGAGCGCGTCAAGCGGGACATGGGCCCCGGTCGATGTGCTGGTCAACAA 300
V E A F E R V K R D M G P V D V L V N N

301 CGCGGGCATCACCCGCGACGGCCTGTTCCGCAAGATGAGCGCCGACGACTGGCGCGCGGT 360
A G I T R D G L F R K M S A D D W R A V

361 CATCGACACCAACCTGAACAGCCTCTTCAACGTGACCAAGCAGGTGATCGACGACATGGT 420
I D T N L N S L F N V T K Q V I D D M V

421 CGAGCGCCAGTGGGGCCGCATCGTCAACATCAGCTCGGTGAACGGGCAGAAGGGGCAGTT 480
E R Q W G R I V N I S S V N G Q K G Q F

481 CGGCCAGACGAACCTATTCCACGGCGAAGGCGGGCATCCATGGCTTACCATGGCGCTGGC 540
G Q T N Y S T A K A G I H G F T M A L A

541 GCAGGAAGTGGCCAGCAAGGGCATCACGGTCAACACGGTGTGCGCGGGCTACATCGGCAC 600
Q E V A S K G I T V N T V S P G Y I G T

601 GGACATGGTTCGCGCCATCCGTCCGGACGTGCTGGAAGATCGTCGCCACCATTCCGGT 660
D M V R A I R P D V L E K I V A T I P V

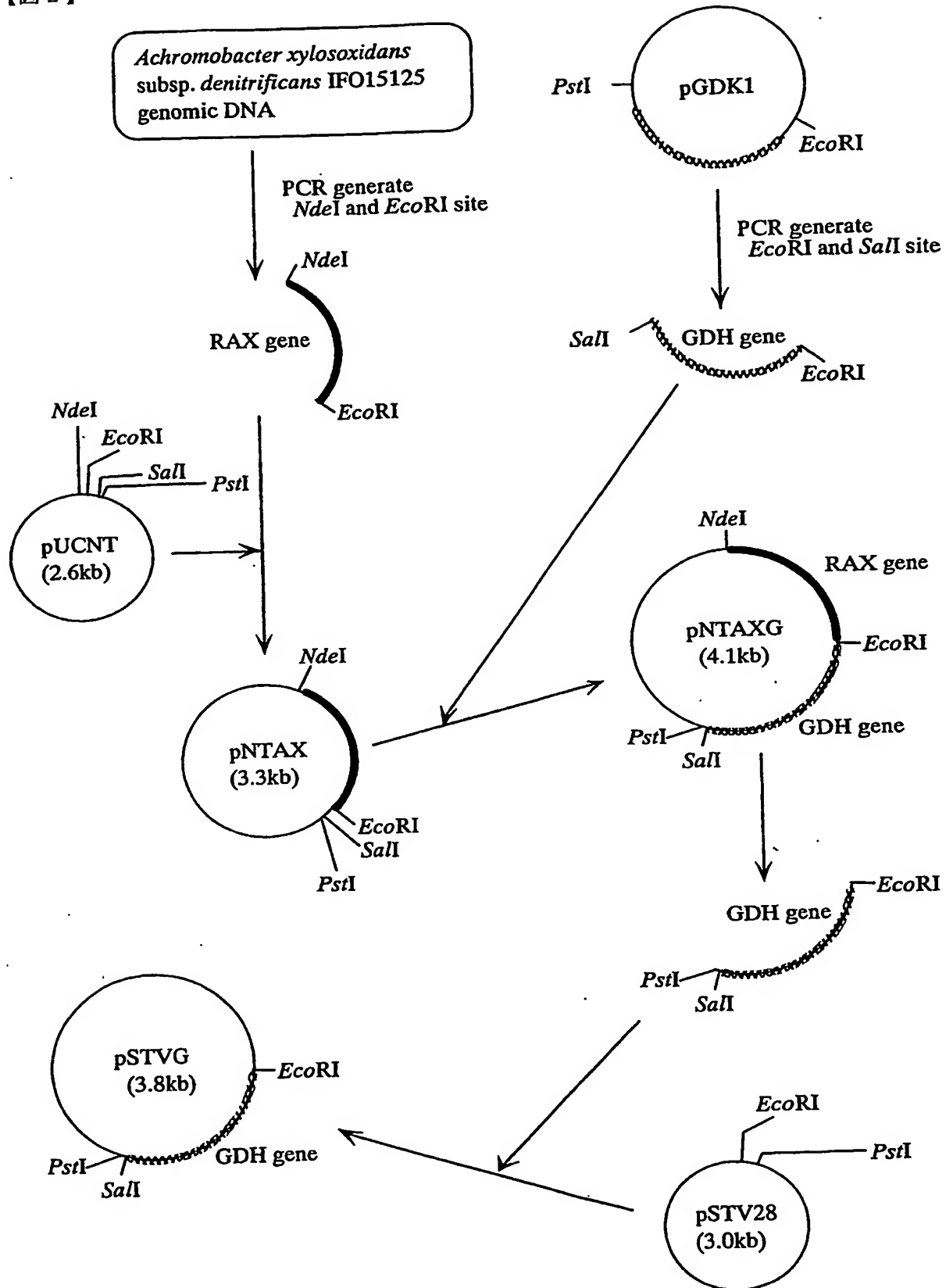
661 GCGCCGCCTGGGCACGCCGAGGAAATCGCGTCCATCACGTGCTGGCTGGCCTCGGATGA 720
R R L G T P E E I A S I T S W L A S D E

721 GTCTGGGTTTTGACGGGCGCGGACTTCTCGCTCAACGGGCGCCTGCATATGGGCTGAAG 780
S G F S T G A D F S L N G G L H M G *

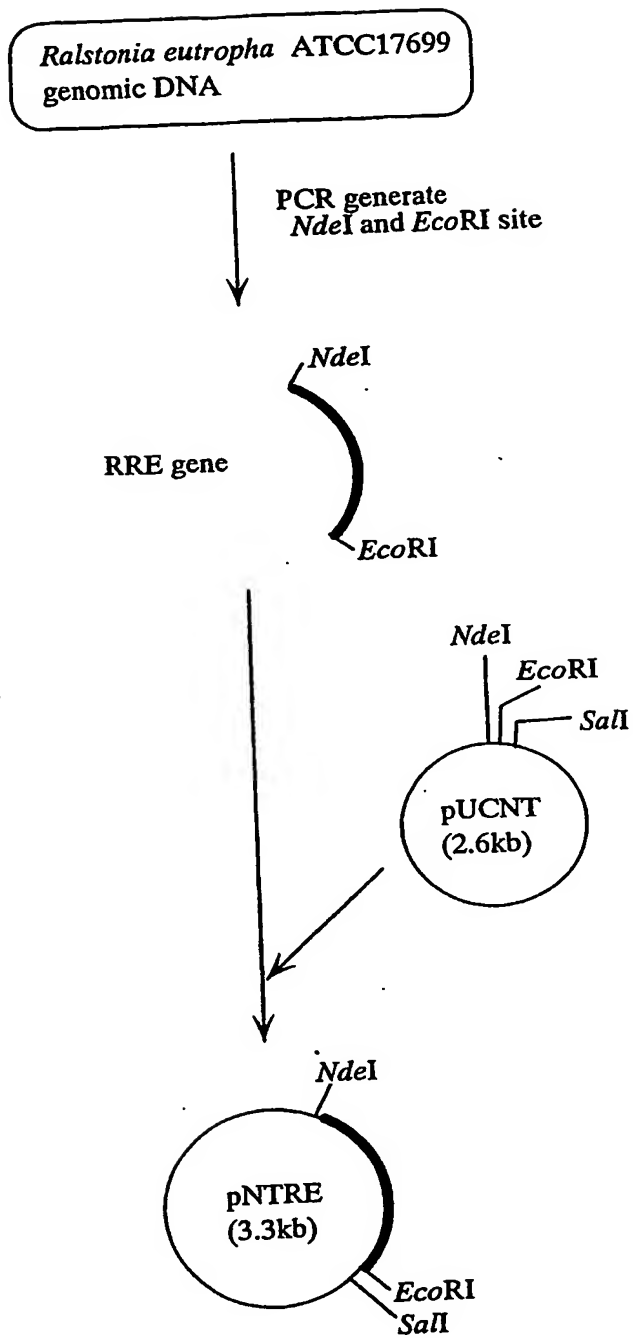
781 CATCGCGGGCCGCCACGAGCGGCCCGCGCGCGGGCGGCTCGGGGAGAGGGCCGTCC 840

841 GGCATTACACTTACCCTTATCCGAAGTCTTAGAGATCGCCGATCCGGGGACAACCATGA 900

【図 2】



【図 3】



【書類名】要約書**【要約】**

【課題】 (R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル、光学活性 3-ヒドロキシブタン酸エステル或いは光学活性 1-フェニルエタノール誘導体の光学活性アルコールの簡便な製法を提供する。また、上記光学活性アルコール、特に (R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの製造に有用な新規酵素を提供する。

【解決手段】 3-ケトペンタンニトリルを不斉還元して 99% e. e. 以上の (R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成しうる新規アセトアセチル CoA 還元酵素。および、3-ケトペンタンニトリル、アセト酢酸エステルあるいは 1-フェニルエタノン誘導体に当該新規酵素若しくは既知のアセトアセチル CoA 還元酵素を作用させ、対応する光学活性アルコールを製造する方法。

【選択図】 なし。

特願 2 0 0 3 - 3 8 0 9 8 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 9 4 1]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区中之島 3 丁目 2 番 4 号

氏 名

鐘淵化学工業株式会社

2. 変更年月日

2 0 0 4 年 9 月 1 日

[変更理由]

名称変更

住 所

大阪府大阪市北区中之島 3 丁目 2 番 4 号

氏 名

株式会社カネカ

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/016666

International filing date: 10 November 2004 (10.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-380987
Filing date: 11 November 2003 (11.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 27 January 2005 (27.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse